

原 著

骨転移モデルマウスを用いた骨転移痛の 発症機序と放射線治療の効果

生理学 (生体情報)

小林 俊策

要 旨 悪性骨腫瘍あるいはがんの骨転移の患者の多くが重篤な痛みを苦しんでいる。X線照射は、これらの疼痛を和らげるためにしばしば用いられている。腫瘍による骨性痛の発症機序は多様であり、その一部は神経障害性疼痛の要因によると考えられる。神経障害性疼痛の発症機序の一つとして、脊髄後角表層ニューロンの細胞膜内外のクロライド濃度勾配の障害がある。今回の研究では、腫瘍による骨性痛の発症にクロライド濃度勾配の障害が関与しているかを検討した。実験には、NCTC2472がん細胞をC3H/HeNマウスの大腿骨に接種する骨転移モデルマウスを用いた。また、20グレイのX線照射による除痛効果についても検討した。腫瘍による骨性痛は、KCC2の発現減少、Iba1およびGFAPの発現増加を伴っていた。これらの事は、クロライド電流の逆転電位の脱分極側へのシフトを示唆する。大腿骨局部へのX線照射後4日目には、腫瘍による骨性痛の緩和が見られ、KCC2、Iba1およびGFAPの発現レベルが正常値へ戻った。クロライドの恒常性障害が、脊髄後角における興奮性シナプス伝達の脱抑制を起し腫瘍による骨性痛を惹起する。また、X線照射による除痛の一部はクロライドの恒常性の正常化によると推測される。

Key Words : KCC2, GABA, 脊髄後角, 腫瘍による骨性痛, X線除痛

緒 言

悪性骨腫瘍あるいはがんの骨転移の患者の多くが、重篤な耐え難い痛みを苦しんでいる。この腫瘍による骨性痛を効果的に緩和することは困難であることが多い¹⁾。除痛のための様々な試みがなされており、担がん骨へのX線照射はしばしば用いられる除痛法である²⁻⁴⁾。

腫瘍による骨性痛は、腫瘍原性、炎症原性および神経障害性の因子の組み合わせによって起こると推測されている⁵⁾。腫瘍による骨性痛の発症機序については多くの研究がなされてきている。最近のげっ歯類の腫瘍による骨性痛モデルを用いた報告によれば、腫瘍による骨性痛マウスの脊髄後角に神経化学的な変化が起きている^{6,7)}。さらに、電気生理学的研究によれば、この腫瘍による骨性痛発症時は脊髄後角侵害受容性ニューロンの興奮性が高まっている²³⁾。これらの報告から、中枢性感作が脊

髄後角内に起きていることが腫瘍による骨性痛の発症機序の一つであることが示唆される。

最近の研究によれば、神経障害性疼痛は、脊髄後角表層の神経細胞特異的カリウム-クロール共役担体2 (neuron-specific K-Cl cotransporter2 : KCC2) 発現レベルの低下を伴っている⁸⁻¹⁰⁾。脊髄後角表層は疼痛情報のシナプス伝達とその調整が行われている部位である¹¹⁾。KCC2発現レベルの低下は細胞膜を隔てるクロライドイオンの分布変化を惹起し、その結果、GABA_A受容体を介するシナプス抑制が減弱する(すなわち、脱抑制)⁸⁻¹⁰⁾。さらには、活性化したマイクログリアからの脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor : BDNF) の放出がこれらの変化に関与することも報告されている^{8,12)}。

今回の研究では、脊髄における神経細胞の変化とX線照射により疼痛軽減が図られた後の脊髄神経細胞の変化を検討することにより、腫瘍による骨性痛の発症機序に神経障害性疼痛と共通の要因があることを示すことを目的として、骨転移モデルマウスにおいて、脊髄における変化をグリア細胞に特異的に発現する細胞マーカーであるグリア細胞線維性酸性タンパク質 (Glial fibrillary

平成27年11月6日受付, 平成27年12月1日受理

別刷請求先: 小林俊策

〒343-0816 埼玉県越谷市弥生町17-2-907

生理学 (生体情報)

acidic protein : GFAP), イオン化カルシウム結合アダプター分子 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1 : Iba1) を通じて確認し, 脊髄後角表層内の GABA_A 受容体を介するシナプス伝達の変化について調べた. また, この変化を惹起する神経化学的機序について検討した. さらに, 担がん骨への X 線照射による除痛効果のシナプス機序についても検討を加えた. このような研究によって, 腫瘍による骨性痛発症の詳細な機序が解明され, X 線照射による除痛効果をさらに高めるための手がかりが得られると考えられる.

方 法

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て行われた.

1. 対 象

本研究では日本クレア株式会社より購入した, 生後 4-5 週齢の C3H/HeN 雄性マウスを疼痛マウス群, 疼痛緩和マウス群, 対照群に分けて研究を行った. 飼育室の明暗周期を 12 時間とし, 全ての実験は明期に行った. また, 餌・水分は自由に摂取できるようにした.

2. マウス作製

1) 骨転移モデルマウス (疼痛マウス) の作製

作製はハロセンの吸入による全身麻酔下で行った.

右膝蓋骨上の皮膚を切開し, 膝蓋腱の剖出を確認. 膝蓋腱を切除し, 大腿骨遠位端を剖出した. 同部より注射針を用いて骨髓腔への細孔を作製し, 電気ドリルを用いて 0.5mm 程度まで細孔を拡大, その後, 1×10^5 個の NCTC2472 がん細胞を骨髓腔内に注入し歯科用アマルガムにて細孔を閉鎖した.

2) 対照群マウスの作製

対照群は NCTC2472 がん細胞の代わりにリン酸緩衝生理食塩水を骨髓腔に注入した.

3) 疼痛緩和マウスの作製

腫瘍による骨性痛の緩和を目的として, NCTC2472 がん細胞注入 14 日目に日立パワーソリューションズ製 MBR-1505R2 を照射用装置として用いて X 線照射を行った.

ハロセン麻酔下に 30ml の注射器を利用した固定具に患側肢を注射器から出した状態でマウスを固定. 麻酔から覚醒していることを確認し, 照射装置にて 20 グレイの X 線を 1 回照射した. 照射の際, 他部位への X 線照射を防ぐ目的で, 固定用注射器上より低融点鉛による遮

蔽用ブロックを用いて患肢以外の部位を保護した.

3. 疼痛評価 (von Frey 試験)

作製前と作製後 21 日目まで, ナイロン製の繊維で作られた von Frey filament を用いて, 患側肢に機械的刺激を 10 回加え, それに対する逃避行動を示した割合を測定し疼痛を評価した.

4. 免疫染色

注入後 21 日目に疼痛マウスをケタミン 100mg/kg とキシラジン 10mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドで経心的に灌流固定し, 脊髄を摘出した. 摘出された脊髄はスライサー (Microslicer, D.S.K., Japan) を用いて 450 μ m の脊髄スライス標本作製した. 作製した脊髄スライス標本にウサギ血清を用いて非特異反応をブロックした後, Anti-NeunN 抗体 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いて一次抗体反応を行った. 続いて anti-GFAP 抗体 (MBL, Nagoya, Japan) 及び anti-Iba1 抗体 (Wako, Osaka, Japan) を作用させ標識二次抗体反応起こし, diamino benzidine を用いた発色・対比染色を行った.

免疫染色後, 得られた切片を CCD カメラ (DP72) が搭載されたシステム顕微鏡 BX53 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した.

5. Western blot 法

ハロセン麻酔下に脊髄腰部膨大部を摘出した. 癌細胞を移植した側, および反対側の脊髄後角表層を剖出し, 組織の体積の 3 倍量のサンプルバッファー内でホモゲナイズした. 蛋白サンプルを sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE ; 10%) 電気泳動し, polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した.

PVDF 膜をマウス Anti-Iba1 抗体 (1 : 2000 ; Santa Cruz Biotech, USA), マウス Anti-GFAP 抗体 (1 : 2000 ; Santa Cruz Biotech) またはマウス α -tubulin (1 : 2000 ; Santa Cruz Biotech) でインキュベートしたのち, アルカリフォスファターゼ IgG 抗体 (Invitrogen, USA) および chemiluminescence キット (Invitrogen, USA) によって可視化した. バンドは Fluor S Multi-Imager (Bio-Rad Laboratories, USA) によって検出し, Image J freeware (NIH, USA) を用いて定量化した.

6. リアルタイム RT-PCR 法

注入後 21 日目に疼痛マウス及び疼痛緩和が得られたマウスをケタミン 100mg/kg とキシラジン 10mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔下に, マウスの椎弓を切除

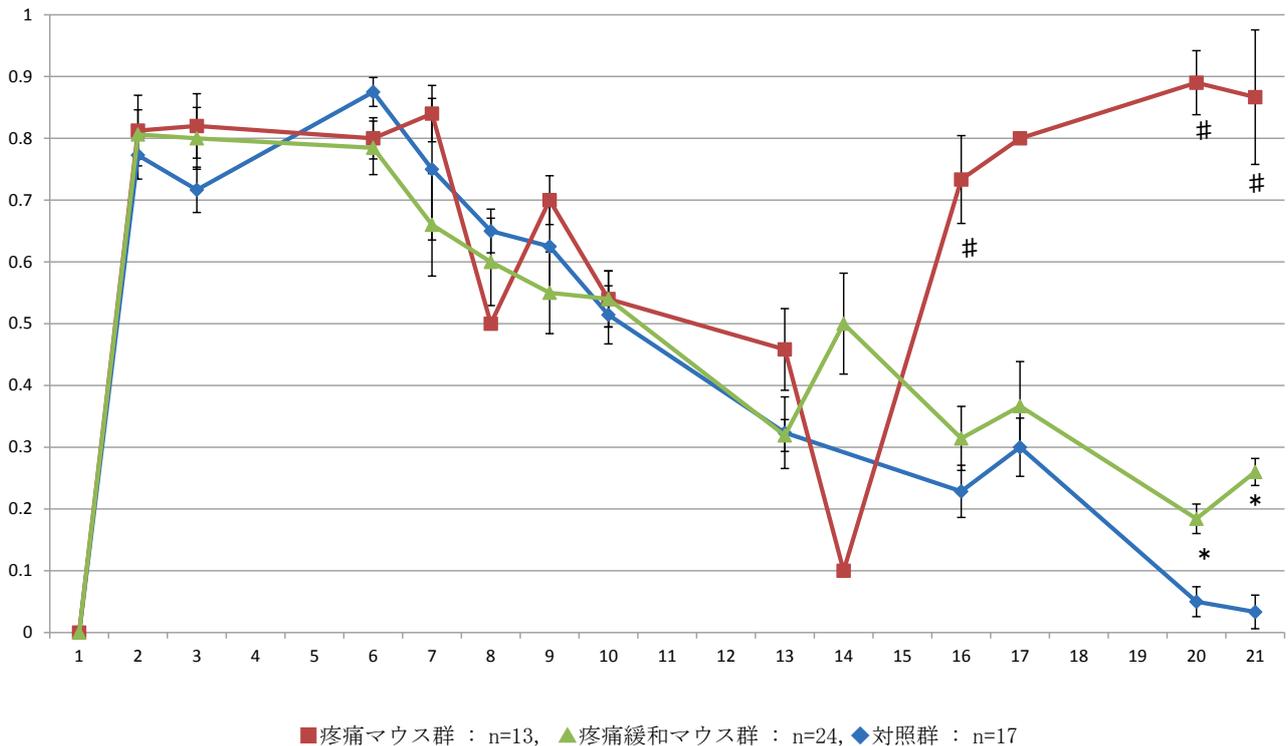


図1 von Frey 試験の結果

縦軸は10回機械刺激を加え、それに対して逃避行動を示した割合を、横軸は手術当日を1日目とした手術後日数を、■は疼痛マウス、▲は疼痛緩和マウス、◆は対照群を示す。

#は骨性疼痛モデルマウス群と緩和マウス及び対照群との比較でいずれも有意差を認めたことを ($p < 0.05$),

*は緩和マウス群と対照群に有意差 ($p < 0.05$) がみられたことを示す。

し、脊髄を摘出した。摘出した脊髄はアイソジェン（日本ジーン, Tokyo, Japan）を用いて KCC2 mRNA を抽出した。その後、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。この cDNA から TaqMan probe を用いて KCC2 の発現量を定量し、評価した。定量は KCC2 の発現量を GAPDH で標準化し、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法によって比較定量した。

7. 統計解析

全ての結果は平均値 ± 標準誤差で示し、対照群との比較には Student の t 検定を用いた。また、von Frey 試験の解析には一元配置分散分析法 (one-way analysis of variance: one-way ANOVA) を用い、事後検定は Tukey の多重比較検定を行った。統計的有意水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

1. von Frey 試験

図1に von Frey 試験の結果を示す。注入前の機械刺激に対する逃避行動はいずれの群間でも認められなかった。注入後翌日より7日目まで、いずれの群においても

注入前と比較して、明らかに刺激に対する逃避行動を示す回数が増加した。この期間においてはいずれの群間にも有意差は認めなかった。7日目以降、いずれの群においても刺激に対する逃避行動を示す回数が減少していったが、疼痛マウス群では14日目まで逃避行動の回数が減少していたが、その後再び逃避行動を示す回数が増加した。注入13日目まで両群および疼痛緩和マウス群との間に有意差は認められなかったが、16日目以降では疼痛マウス群と疼痛緩和マウス群間及び、疼痛マウス群と対照群間に有意差を認めた ($p < 0.05$)。疼痛緩和マウス群と対照群では注入16日目までは両者に有意差を認めなかったが、注入後20日目以降では両群間に有意差を認めた。(疼痛マウス群: $n = 13$, 疼痛緩和マウス群: $n = 24$, 対照群: $n = 17$)

2. 組織学的検討

免疫染色の結果を図2に示す。GFAP 及び Iba1 のいずれにおいても疼痛マウス群は対照群と比較して発現量が増加しており、また、同一マウスにおいても患側の発現量は健側の発現量よりも増加していることが示された。

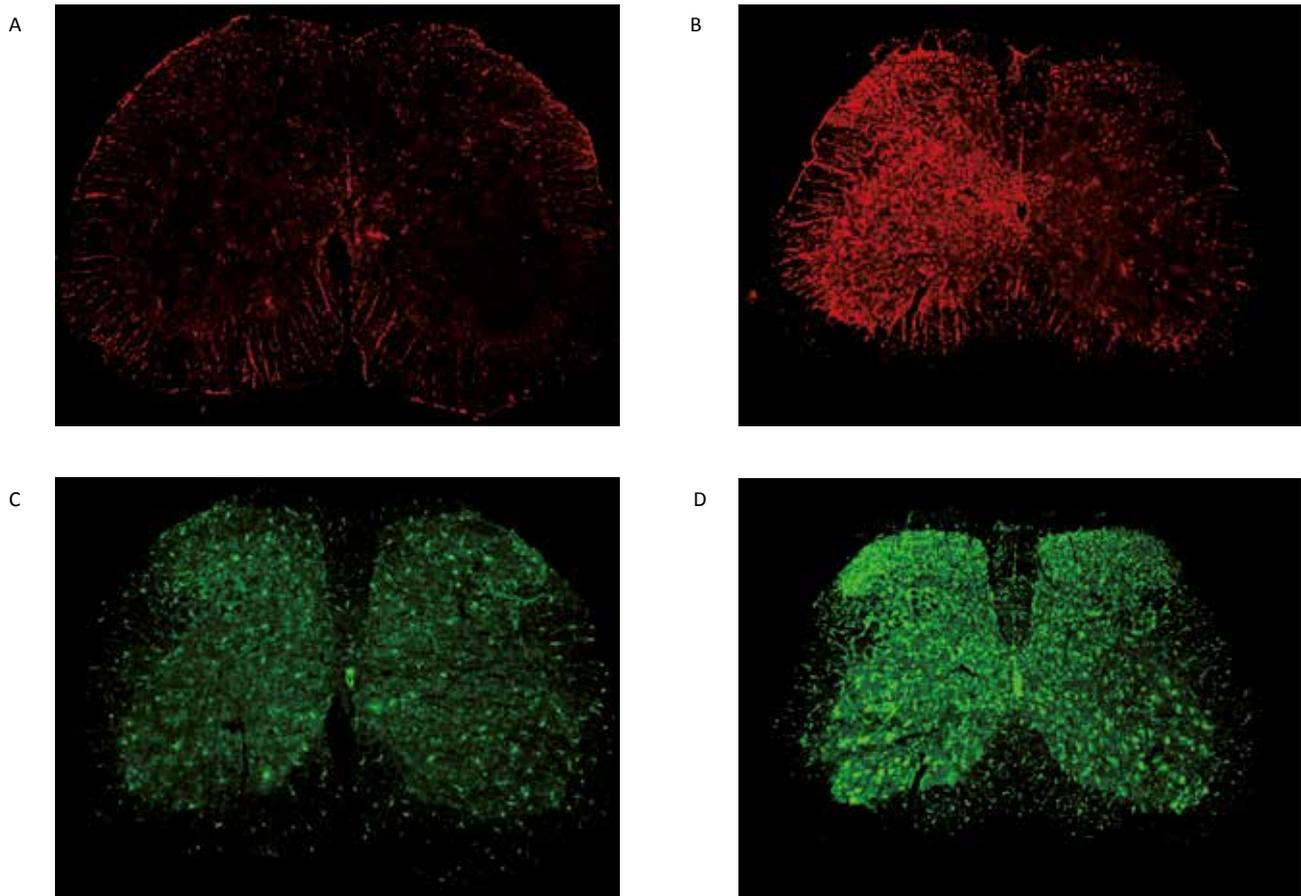


図2 GFAP および Iba1 の免疫染色

A) は対照群マウス, B) は疼痛マウスの GFAP を示す. C) は対照群マウスの Iba1 を, D) は疼痛マウスの Iba1 である. GFAP, Iba1 いずれも対照群マウスよりも疼痛マウスの方が発現量が増加していた. 同一個体においても, 患側肢の発現量が健側肢の発現量よりも多いことが示されている.

3. Western blot 法

図3に Western blot 法の結果を示す. Western blot 法においても, 脊髓後角において疼痛マウス群と対照群を比較して, GFAP の発現量増加が認められた ($P < 0.05$). (疼痛マウス群: $n=3$, 対照群: $n=3$). 同様に Iba1 についても脊髓後角における発現量が増加していた ($P < 0.05$). (疼痛マウス群: $n=4$, 対照群: $n=4$)

4. リアルタイム RT-PCR 法

リアルタイム RT-PCR 法の結果を図4に示す. 対照群と比較して疼痛マウス群は有意に KCC2 の mRNA 発現量が減少していることが示された ($p < 0.05$). 一方で疼痛緩和群では KCC2 の mRNA 発現量は回復し, 疼痛マウス群との間に有意差が認められた ($p < 0.05$). (疼痛マウス群: $n=12$, 疼痛緩和マウス群: $n=12$, 対照群: $n=12$)

考 察

Von Frey 試験の結果より16日目以降において, NCTC2472 がん細胞注入による骨がん性疼痛が発症していることと, X線の照射が疼痛緩和をもたらしていることを示していると考えられる. これは, 骨転移マウスモデルにおいてがんの増殖に伴って異痛症が発症するとする従来の報告と一致している^{7,13}).

今回の研究では, 腫瘍による骨性痛には, 脊髓後角表層 KCC2 発現は減少し, Iba1 および GFAP 発現は増加していることを示した. さらに, 動物の行動観察の結果, がん細胞を移植した大腿骨への X 線照射はこの腫瘍による骨性痛を減弱した, X 線による除痛は, 照射後4日目には観察され, その後4週間にわたって持続した (Data not shown). X 線による除痛に伴って, KCC2, Iba1 および GFAP 発現レベルは正常レベルに近づいた.

今回の研究に用いたのと同じ X 線の一回照射が, 腫瘍による骨性痛に対して除痛効果を示すことは, 動物実

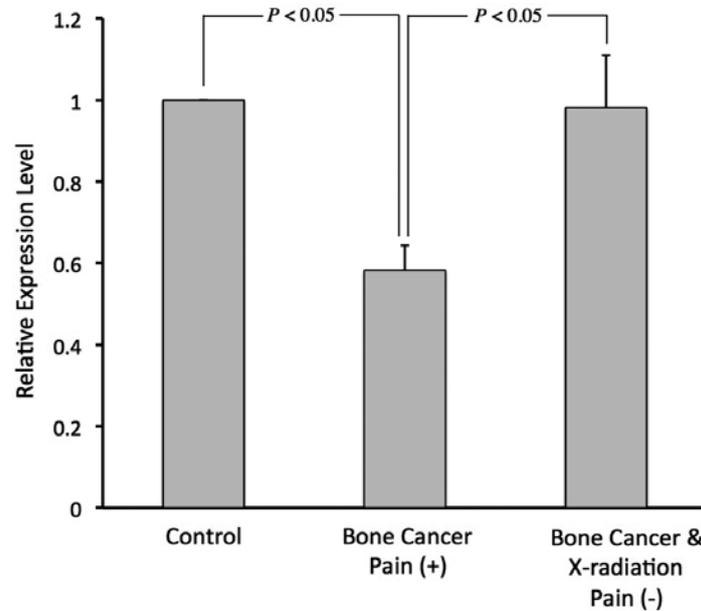
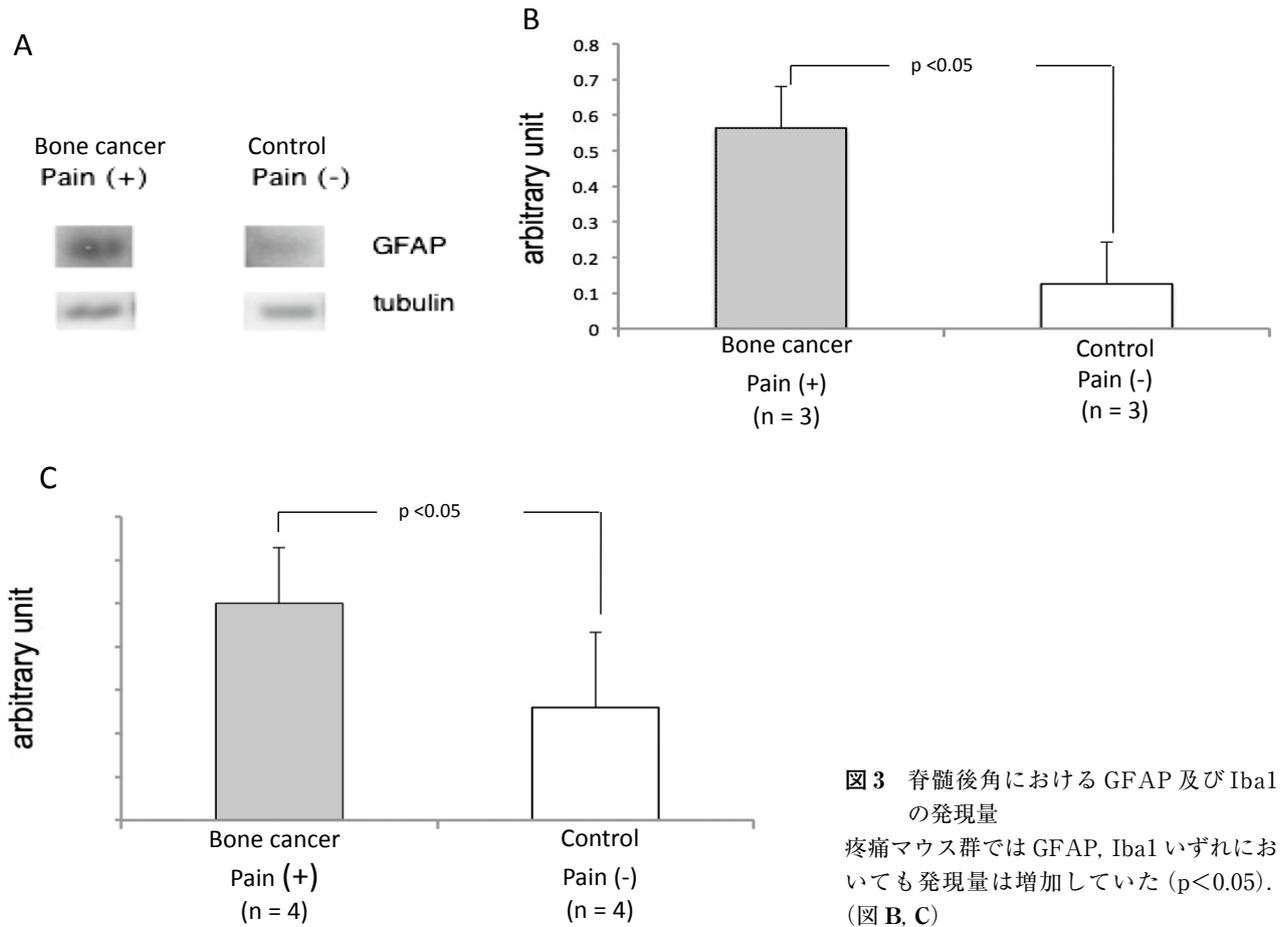


図 4 脊髄後角における KCC2 の発現量
疼痛マウス群, 緩和マウス群, 対照群の脊髄後角における KCC2 の発現量を示す. 疼痛マウス群では KCC2 mRNA の発現量は減少し ($p < 0.05$), 疼痛緩和群では回復している ($p < 0.05$).

験においてすでに知られている¹⁴⁾。また、臨床研究において、同じ X 線の一回照射が除痛効果を示すことが知られている^{2~4,15,16)}。

今回の研究では、X 線による除痛は、照射後 4 日目にはすでに観察された。照射後 4 日目には、大腿骨に移植した癌細胞塊の大きさは有意な変化を示さなかった (Data not shown)。このように腫瘍塊の大きさの減少を伴わずに除痛が得られることはすでに報告されており、X 線照射による除痛機序が単なる腫瘍塊の萎縮によるものではないことを意味している^{14,16,17)}。

脊髄後角表層において、疼痛情報のシナプス伝達は GABA_A 受容体を含む様々な神経伝達物質受容体によって調節されている。GABA_A 受容体はクロライドイオンに透過性のあるイオン型受容体である²⁾。生理的条件下では、GABA_A 受容体の活性化はクロライドイオンの流入を引き起こす。その結果、膜電位は過分極性の変化を示し、神経細胞の興奮性が減弱する¹⁸⁾。

GABA_A 受容体の活性化が抑制性の作用を示すか、興奮性の作用を示すかは、細胞膜を介するクロライドイオンの濃度勾配に依存している。クロライドイオンの濃度勾配は、陽イオン-クロライド輸送体であるナトリウム-カリウム-クロライド供役輸送体 1 (Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter1 : NKCC1) と KCC2 の機能に依存している^{19,20)}。NKCC1 はクロライドイオンを細胞内に輸送し、KCC2 はクロライドイオンを細胞外に輸送する。NKCC1 と KCC2 の機能のバランスの崩れが細胞内クロライドイオン濃度の上昇を起し、結果、神経障害性疼痛、脊髄損傷などの様々な中枢神経障害の発症に関与する²⁰⁾。今回の研究で見出された KCC2 の発現減少が、細胞内のクロライドイオン濃度の上昇を起し、その結果として GABA_A 受容体を介するシナプス電流の逆転電位が脱分極方向にシフトすることが腫瘍による骨性痛の発症機序であることが示唆される。

今回の研究では、腫瘍による骨性痛に伴って Iba1 の発現が増加していた。これは、マイクログリアが活性化していることを意味する。悪性骨腫瘍の進展に伴って脊髄内のマイクログリアが活性化することはすでに報告されている²⁴⁾。活性化したマイクログリアから BDNF が放出される^{8,21)}。BDNF によって TrkB 受容体が活性化し、その結果、KCC2 の発現が抑制される¹²⁾。これらの従来の報告と呼応する形で、骨転移モデルマウスの脊髄後角において、Iba1 および GFAP 発現が上昇し、KCC2 発現が減少した。このような遺伝子発現の変化より、脊髄後角表層の GABA 作動性抑制が減弱していることが示唆される。

今回の X 線照射実験では、担がん骨への局所的な照

射が速やかな除痛効果を示した。さらに、X 線照射による除痛が腫瘍塊の大きさの減少を伴わずに見られることが報告されている^{14,16,17)}。このことは X 線が炎症メディエーターに作用して除痛効果を惹起する可能性を示唆している¹⁷⁾。他の可能性として、X 線照射が中枢神経系の神経伝達物質あるいは伝達物質受容体の発現レベルの変化を起こすことが考えられる^{14,22)}。今回の研究は、この可能性を支持している。すなわち、X 線照射によって腫瘍による骨性痛の除痛が得られ、Iba1,GFAP,KCC2 の発現レベルも正常レベルに戻ったと考えられる。

結 論

今回の研究結果は、クロライドイオンの恒常性の障害によって脊髄後角表層の興奮性シナプス伝達が脱抑制することが腫瘍による骨性痛の発症機序の少なくとも一部をなしていることを示唆している。さらに、担がん骨への X 線照射による速やかな除痛の少なくとも一部は、クロライドイオンの恒常性が復旧し脊髄後角表層のシナプス抑制機構が回復することによってもたらされると考えられる。しかしながら、担がん骨局所への X 線照射が脊髄後角内のこのような変化を惹起する機序については、現在のところ不明である。

謝 辞 本研究は Dokkyo Medical University, Young Investigator Award 2013 の助成を受けたものである。

稿を終えるにあたり、本研究と論文報告のご指導賜った獨協医科大学生理学 (生体情報) 教室の先生方一同に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Foley KM : Advances in cancer pain. Arch Neurol **56** : 413-417, 1999.
- 2) Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, Clohisy DR, Mantyh PW : Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. Neuroscience **98** : 585-598, 2000.
- 3) Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB : Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. Nat Clin Pract Neurol **4** : 490-503, 2008.
- 4) Willis WD, Coggeshall RE : Sensory Mechanisms of the Spinal Cord, Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, 2004.

- 5) Poulsen HS, Nielsen OS, Klee M, Rorth M : Palliative irradiation of bone metastases. *Cancer Treat Rev* **16** : 41-48, 1989.
- 6) Hoskin PJ : Radiotherapy for bone pain. *Pain* **63** : 137-139, 1995.
- 7) Steenland E, Leer JW, van Houwelingen H, Post WJ, van den Hout WB, Kievit J, de Haes H, Martijn H, Oei B, Vonk E, van der Steen-Banasik E, Wiggenraad RG, Hoogenhout J, Warlam-Rodenhuis C, van Tienhoven G, Wanders R, Pomp J, van Reijn M, van Mierlo I, Rutten E : The effect of a single fraction compared to multiple fractions on painful bone metastases : a global analysis of the Dutch Bone Metastasis Study. *Radiother Oncol* **52** : 101-109, 1999.
- 8) Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y : BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* **438** : 1017-1021, 2005.
- 9) Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y : Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* **424** : 938-942, 2003.
- 10) Seong J, Park HC, Kim J, Kim UJ, Lee BW : Radiation-induced alteration of pain-related signals in an animal model with bone invasion from cancer. *Ann N Y Acad Sci* **1030** : 179-186, 2004.
- 11) Yang Y, Li H, Li TT, Luo H, Gu XY, Lu N, Ji RR, Zhang YQ : Delayed activation of spinal microglia contributes to the maintenance of bone cancer pain in female Wistar rats via P2X7 receptor and IL-18. *J Neurosci* **35** : 7950-7963, 2015.
- 12) Schwei MJ, Honore P, Rogers SD, Salak-Johnson JL, Finke MP, Ramnaraine ML, Clohisy DR, Mantyh PW : Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J Neurosci* **19** : 10886-10897, 1999.
- 13) Mercadante S : Malignant bone pain : pathophysiology and treatment. *Pain* **69** : 1-18, 1997.
- 14) Yanagisawa Y, Furue H, Kawamata T, Uta D, Yamamoto J, Furuse S, Katafuchi T, Imoto K, Iwamoto Y, Yoshimura M : Bone cancer induces a unique central sensitization through synaptic changes in a wide area of the spinal cord. *Mol Pain* **6** : 38, 2010.
- 15) Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, Nanobashvili A, Kokaia Z, Airaksinen MS, Voipio J, Kaila K, Saarma M : BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K^+-Cl^- cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl^- extrusion. *J Cell Biol* **159** : 747-752, 2002.
- 16) Rohrbough J, Spitzer NC : Regulation of intracellular Cl^- levels by $Na^{(+)}$ -dependent Cl^- cotransport distinguishes depolarizing from hyperpolarizing GABA_A receptor-mediated responses in spinal neurons. *J Neurosci* **16** : 82-91, 1996.
- 17) Price P, Hoskin PJ, Easton D, Austin D, Palmer SG, Yarnold JR : Prospective randomised trial of single and multifraction radiotherapy schedules in the treatment of painful bony metastases. *Radiother Oncol* **6** : 247-255, 1986.
- 18) Bonin RP, De Koninck Y : Restoring ionotropic inhibition as an analgesic strategy. *Neurosci Lett* **557** : 43-51, 2013.
- 19) Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT, Cherubini E : The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist* **18** : 467-486, 2012.
- 20) Mantyh PW : A mechanism-based understanding of bone cancer pain. *Novartis Found Symp* **261** : 194-214 ; discussion 214-199, 256-161, 2004.
- 21) Ferrini F, De Koninck Y : Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. *Neural Plast* **2013** : 429815, 2013.
- 22) Vit JP, Ohara PT, Tien DA, Fike JR, Eikmeier L, Beitz A, Wilcox GL, Jasmin L : The analgesic effect of low dose focal irradiation in a mouse model of bone cancer is associated with spinal changes in neuro-mediators of nociception. *Pain* **120** : 188-201, 2006.
- 23) Hartsell WF, Scott CB, Bruner DW, Scarantino CW, Ivker RA, Roach M 3rd, Suh JH, Demas WF, Movsas B, Petersen IA, Konski AA, Cleeland CS, Janjan NA, DeSilvio M : Randomized trial of short- versus long-course radiotherapy for palliation of painful bone metastases. *J Natl Cancer Inst* **97** : 798-804, 2005.
- 24) Lozano-Ondoua AN, Wright C, Vardanyan A, King T, Largent-Milnes TM, Nelson M, Jimenez-Andrade JM, Mantyh PW, Vanderah TW : A cannabinoid 2 receptor agonist attenuates bone cancer-induced pain and bone loss. *Life Sci* **86** : 646-653, 2010.

**Mechanisms for Metastatic Cancer Pain and its Relief by Radiation : Analysis Using
a Mouse Model of Metastatic Bone Cancer**

Shunsaku Kobayashi

Department of Physiology and Biological Information

Many patients with bone cancer experience severe bone pain. Radiation is one of the most commonly used treatments to relieve this pain. Bone cancer pain is thought to occur through multiple mechanisms including a neuropathic component. One of possible mechanisms for neuropathic pain is disturbance of the transmembrane chloride gradient of spinal superficial dorsal horn (SDH) neurons. In the present study, we investigated whether this hypothesis is valid in bone cancer pain. Experiments were performed in a bone cancer pain model, where NCTC 2472 cancer cells were inoculated into the femur of C3H/HeN mice. We analyzed allodynia induced by bone cancer and pain relief following a single fraction of 20-Gy radiation. Bone cancer pain was associated with a depolarizing shift of the reversal potential of GABA_A receptor-mediated currents in the SDH. These changes were accompanied with the down-

regulation of the potassium chloride cotransporter KCC2 and the up-regulation of microglia marker Iba1 and Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). Focal irradiation of the affected femur attenuated bone pain as early as 4 days after irradiation. Along with pain relief, the GABA_A reversal potential and the expression levels of KCC2, Iba1, and GFAP were restored near to their control levels. The present findings suggest that disturbance of chloride homeostasis, which leads to disinhibition of excitatory synaptic transmission in the SDH, may explain bone cancer pain, and that rapid pain relief achieved by local irradiation may be attributed to a restoration of disturbed chloride homeostasis and synaptic inhibition in the SDH.

Key Words : KCC2, GABA, spinal superficial dorsal horn, bone cancer pain, radiation